



อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ชื่อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี)
ที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ 1803001818
วันรับอนุสิทธิบัตร 17 สิงหาคม 2561
ผู้ประดิษฐ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิรมล ศากยวงศ์ และ นายอริย์ธัช ญาติมพลี
แสดงถึงการประดิษฐ์ กรรมวิธีการสกัดสารจากครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ 28 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2563
หมดอายุ ณ วันที่ 16 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2567



(ลงชื่อ).....

(นางสาวนุสรรา กาญจนกุล)

รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน

อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา

ผู้ออกอนุสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

- หมายเหตุ**
1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรจะสิ้นอายุ
 2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวกันได้
 3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 ครั้ง มีกำหนดคราวละ 2 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่
 4. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการสกัดสารจากครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

- 5 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการสกัดสารจากครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- 10 ดันคราม (*Indigofera tinctoria*) อยู่ในวงศ์ฟาบาซีอี (Fabaceae) ลักษณะทั่วไปครามเป็นพืชเขตร้อนและร้อนชื้น เป็นไม้พุ่มเมืองในทวีปเอเชีย จัดเป็นพรรณไม้พุ่มขนาดเล็กตระกูลถั่ว สามารถเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ที่ได้รับแสงแดดตลอดวัน อุณหภูมิอยู่ในช่วง 22-28 องศาเซลเซียส ชอบน้ำน้อย และทนดินเค็มได้ดี
- 15 ดันครามสูงประมาณ 1-2 เมตร ใบมีลักษณะเป็นใบประกอบแบบขนนกเรียงสลับ ปลายใบเดี่ยว ใบย่อยรูปรี แผ่นใบสีเขียวมีลักษณะบาง ดอกช่อออกตามซอกใบ ดอกย่อยรูปดอกถั่ว กลีบดอกสีชมพู หรือสีม่วงแกมน้ำเงิน ผลเป็นฝักคล้าย ฝักถั่ว มีทั้งฝักตรงและฝักโค้ง ภายในฝักมี 7-12 เมล็ด ซึ่งมีสีออกครีมไปถึงน้ำตาลลำต้นมีลักษณะกลมสีเขียวประกอบด้วยข้อและปล้องมีตาและตาดอกเกิดขึ้นบริเวณข้อ เมล็ดของครามมีลักษณะ
- 20 สีเหลี่ยมลูกบาศก์ค่อนข้างกลม ขนาดเล็กมีน้ำหนักเฉลี่ย 3.35-16.14 กรัมต่อ 1,000 เมล็ด คาดว่าต้นครามมีแหล่งกำเนิดจากหมู่เกาะมาเลเชียและเติบโตอย่างเป็นธรรมชาติในทวีปแอฟริกา (Duke, 1981; Bisby *et al.*, 1994; MacLeod, 1997) และเป็นพืชพื้นเมืองในเอเชีย สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย โดยเฉพาะบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ทั้งนี้สารเคมีธรรมชาติที่อยู่ในแต่ละส่วนของครามซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์ ในแง่ของการต่อยอดสู่ผลิตภัณฑ์เวชสำอางจากสารสกัดธรรมชาติที่ได้มาตรฐาน ที่สามารถสร้างรายได้เพิ่มแก่เกษตรกรผู้ปลูกครามและผู้ประกอบการ รวมถึงลดการนำเข้าสารเคมีบางชนิดจากต่างประเทศ

- 25 ทั้งนี้พบงานวิจัยและสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการสกัดสารจากคราม ได้แก่ งานวิจัยของ Srinivasan *et al.*, 2015 แสดงถึงการสกัดแบบซอกท์กเล็ด (Soxhlet extraction) ว่าสามารถทำให้สารสกัดของครามนั้นมีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้สกัดสารจากส่วนต่างๆของคราม ซึ่งผลก็ยังเป็นที่แน่ชัดว่าประสิทธิภาพไม่ได้ลดลงไปเลย สิทธิบัตรอเมริกาเลขที่ US6548052 ได้เปิดเผยการสกัดสารจากครามสายพันธุ์เดียวกันนี้โดยใช้ตัวทำละลายกลุ่มแอลกอฮอล์ น้ำ และ แอลกอฮอล์ผสมกับน้ำ และสิทธิบัตรเกาหลีเลขที่ KR1020120107754 ได้เปิดเผยการสกัดสารจากครามโดยใช้ เอทานอลที่ความ

เข้มข้นร้อยละ 90 ถึง 100 และใช้อัตราส่วนในการสกัด 80 ถึง 120 ส่วน โดยน้ำหนักแห้งของคราม ต่อ สารละลายเอทานอล 240 ถึง 360 ส่วนโดยน้ำหนัก

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้มุ่งถึงการสกัดสารจากคราม โดยกรรมวิธีการสกัด ประกอบด้วยขั้นตอน การลด
5 ความชื้น ที่ซึ่งเลือกใช้วิธีการตากแห้ง หรือ การอบแห้ง หรือ การทำแห้งแช่เยือกแข็ง (Freeze Dried) วิธีใดวิธี
หนึ่ง จากนั้นนำชิ้นส่วนของครามมาบดให้ละเอียดเป็นผงและแยกขนาดอนุภาคโดยเครื่องเขย่าคัดแยกอนุภาค
ด้วยตะแกรง (Shieve shaker) และนำผงครามมาสกัดแบบต่อเนื่องด้วยเครื่องสกัดแบบซอกท์เกล็ด (Soxhlet
Extraction) และนำสารละลายที่สกัดได้มาทำการระเหยแห้งสุญญากาศ ซึ่งสารสกัดที่ได้นั้นสามารถเพิ่มสมบัติ
ต้านอนุมูลอิสระโดยตรวจสอบด้วยวิธี ดีพีพีเอช แรดิคอล สคัฟเฟนิง (DPPH radical scavenging) อย่างมี
10 นัยสำคัญ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการประดิษฐ์นี้เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของต้นครามนอกเหนือจากการนำไป
ย้อมผ้า และสร้างองค์ความรู้ใหม่ที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการเป็นสมุนไพรของคราม นำไปสู่การผลิต
ในเชิงพาณิชย์ในการเป็นส่วนผสมทางยา อาหาร และเครื่องสำอาง ทั้งนี้ยังส่งเสริมอาชีพ องค์ความรู้ และ
สร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกครามได้มากขึ้น

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

15 รูปที่ 1 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (สูงสุด)

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการสกัดสารจากครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยกรรมวิธีการ
สกัดสารจากคราม ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมครามผง

20 นำส่วนต่าง ๆ ของคราม ได้แก่ เมล็ด ใบ ลำต้น ส่วนใดส่วนหนึ่งหรือรวมกันสองส่วนขึ้นไป
มาทำความสะอาดด้วยน้ำ แล้วนำไปลดความชื้น ซึ่งสามารถใช้วิธีการลดความชื้นคือ ตากแห้งเป็น
เวลา 12 ถึง 32 ชั่วโมง หรือ การอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24
ชั่วโมง หรือ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) ที่อุณหภูมิ -60 ถึง -100 องศาเซลเซียส
วิธีใดวิธีหนึ่ง ซึ่งตามการประดิษฐ์นี้วิธีลดความชื้นที่ดีที่สุดคือการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ
25 -60 ถึง -100 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดเป็นผง และนำผงครามมาแยกอนุภาคด้วย
เครื่องเขย่าคัดแยกอนุภาคด้วยตะแกรง (Shieve shaker) จนได้ขนาด 0.2 ถึง 0.7 มิลลิเมตร

2. การสกัดสาร

นำผงครามมาสกัดสารแบบต่อเนื่องด้วยเครื่องสกัดแบบซอกท์เกล็ด (Soxhlet Extraction)

โดยใช้อัตราส่วน 1 ถึง 5 ต่อ 20 ถึง 50 ของน้ำหนักแห้งของคราม ต่อปริมาตรตัวทำละลายความเข้มข้นร้อยละ 70 ถึง 100 ซึ่งใช้อุณหภูมิในการสกัดที่ 80 ถึง 120 องศาเซลเซียส และใช้น้ำอุณหภูมิ 5 ถึง 10 องศาเซลเซียสในการควบแน่นสารละลาย จำนวน 3 ถึง 7 ครั้ง ใช้เวลาสุทธิ 5 ถึง 9 ชั่วโมง โดยตัวทำละลายที่เลือกใช้ ได้แก่ เอทานอล (Ethanol) เมทานอล (Methanol) น้ำ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และ อะซิเตท (Acetate) เลือกใช้อย่างใดอย่างหนึ่ง

5

3. การระเหยแห้ง

นำสารละลายที่ได้จากการสกัดไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส และอัตราการหมุน 30 ถึง 110 รอบต่อนาที จนเหลือปริมาตรของสารละลายสกัดหยาบ 1 ถึง 20 ส่วนใน 100 ส่วนของสารละลายตั้งต้น

10

กรรมวิธีตามการประดิษฐ์ดังที่กล่าวมาข้างต้นเป็นกรรมวิธีการสกัดที่ไม่ซับซ้อนและสารที่สกัดสามารถนำไปใช้ในการต้านอนุมูลอิสระได้ ดังแสดงตัวอย่างการเตรียมสารสกัดจากคราม ดังต่อไปนี้

ตัวอย่าง การเตรียมสารสกัดจากครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

นำส่วนต่าง ๆ ของคราม ได้แก่ เมล็ด ใบ ลำต้น มาทำความสะอาดด้วยน้ำ แล้วนำมาลดความชื้นโดยการตากแห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ การอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dried) ที่อุณหภูมิ -60 ถึง -100 องศาเซลเซียส วิธีใดวิธีหนึ่ง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดเป็นผงและนำผงครามมาแยกอนุภาคด้วยเครื่องเขย่าคัดแยกอนุภาคด้วยตะแกรง (Shieve shaker) จนได้ขนาดขนาด 0.2 ถึง 0.7 มิลลิเมตร

15

นำผงครามมาสกัดสารโดยใช้เครื่องสกัดแบบซอกท์กเกล็ด (Soxhlet Extraction) โดยใช้อัตราส่วน 3 ต่อ 40 ของน้ำหนักแห้งของตัวอย่างครามต่อปริมาตรตัวทำละลายความเข้มข้นร้อยละ 98 ซึ่งตัวทำละลายที่เลือกใช้ ได้แก่ เอทานอล (Ethanol) เมทานอล (Methanol) น้ำ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และ อะซิเตท (Acetate) โดยเลือกใช้อย่างใดอย่างหนึ่ง ใช้อุณหภูมิในการสกัดที่ 100 องศาเซลเซียส และใช้น้ำอุณหภูมิ 5 ถึง 10 องศาเซลเซียสในการควบแน่นให้สารละลายไหลลงมาท่วมปลอกสกัดเป็นจำนวน 4 ครั้ง ใช้เวลาสุทธิ 6 ชั่วโมง

20

นำสารละลายที่ได้จากการสกัดไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และอัตราการหมุน 75 รอบต่อนาที

25

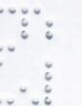
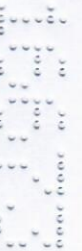
ทั้งนี้ตามการประดิษฐ์นี้พบว่าเมล็ดครามเป็นส่วนที่เหมาะสมที่สุดและเมื่อนำมาผ่านกรรมวิธีลดความชื้นด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dried) ที่อุณหภูมิ -60 ถึง -100 องศาเซลเซียส สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อนำสารสกัดจากเมล็ดครามไปวิเคราะห์พบสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) ร้อยละ 55 กรดปาล์มิติก (Palmitic acid) ร้อยละ 16 กรดสเตียริก (Stearic acid) ร้อยละ 4 สเตกมาสเตอร์อล (Stigmasterol) ร้อยละ 8

30

จากการศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นโดยใช้วิธีดีพีพีเอช แรดิคอล สคัฟเฟนิง (DPPH radical scavenging) ในการตรวจสอบ โดยร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากคราม ทั้งส่วนที่เป็นเมล็ด ลำต้น และใบ ที่ผ่านการลดความชื้นแบบ การตากแห้ง การอบแห้ง และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) เปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก แสดงดังรูปที่ 1 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (สูงสุด)

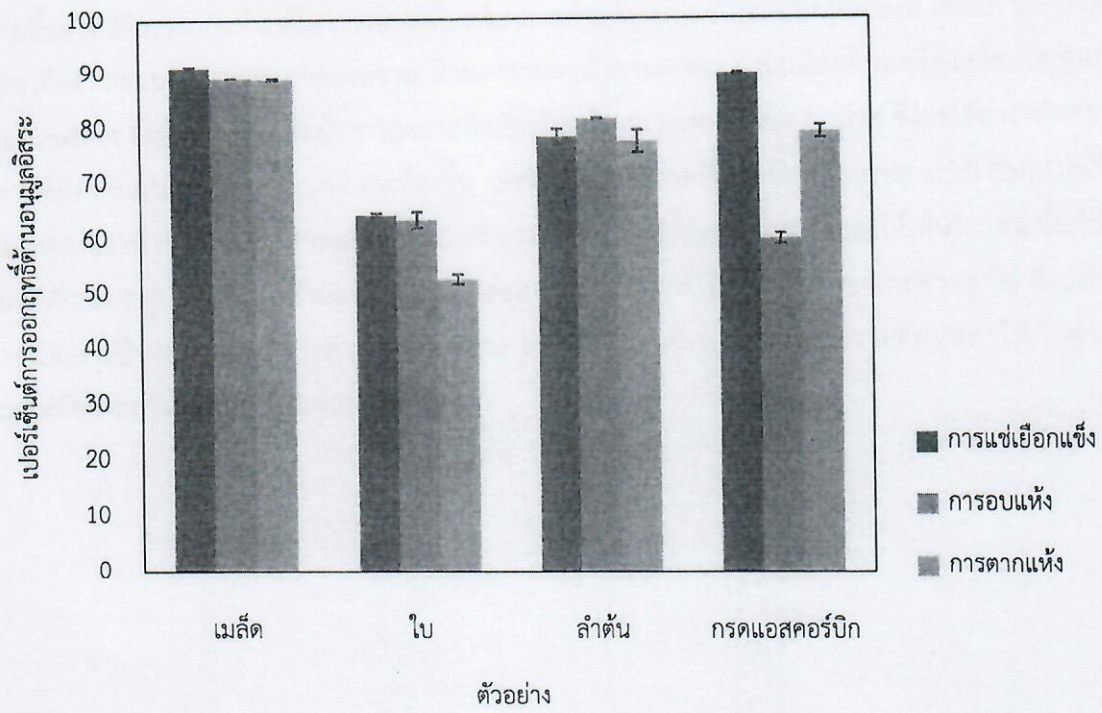
วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์



ข้อถ้อยสิทธิ

1. กรรมวิธีการสกัดสารจากครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้
 - ก) การเตรียมครามผง โดยทำการคัดแยกชิ้นส่วนของคราม นำมาทำความสะอาดด้วยน้ำ และนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ไปลดความชื้น จากนั้นบดให้ละเอียดเป็นผง และนำมาแยกอนุภาคด้วยเครื่องเขย่าคัดแยกอนุภาคด้วยตะแกรง (Sieve shaker) จนได้ขนาด 0.2 ถึง 0.7 มิลลิเมตร
 - ข) การสกัดสาร โดยนำผงครามมาสกัดสารแบบต่อเนื่องด้วยเครื่องสกัดแบบซอกท์กเกล็ด (Soxhlet Extraction) โดยใช้อัตราส่วน 1 ถึง 5 ต่อ 20 ถึง 50 ของน้ำหนักแห้งของคราม ต่อปริมาตรตัวทำละลายความเข้มข้นร้อยละ 70 ถึง 100 ซึ่งใช้อุณหภูมิในการสกัดที่ 80 ถึง 120 องศาเซลเซียส และใช้น้ำอุณหภูมิ 5 ถึง 10 องศาเซลเซียสในการควบแน่นสารละลาย จำนวน 3 ถึง 7 ครั้ง ใช้เวลาสุทธิ 5 ถึง 9 ชั่วโมง
 - ค) การระเหยแห้ง โดยนำสารละลายที่ได้จากการสกัดไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส และอัตราการหมุน 30 ถึง 110 รอบต่อนาที จนเหลือปริมาตรของสารละลายสกัดหยาบ 1 ถึง 20 ส่วนใน 100 ส่วนของสารละลายตั้งต้น
2. กรรมวิธีการสกัดสารจากครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 1 ที่ซึ่งส่วนของครามที่ใช้ในการสกัดเลือกได้จาก เมล็ด ใบ ลำต้น ส่วนใดส่วนหนึ่ง หรือ รวมกันสองส่วนขึ้นไป
3. กรรมวิธีการสกัดสารจากครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 1 ถึง 2 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่งส่วนของครามที่ใช้ในการสกัดที่เลือกใช้คือ เมล็ด
4. กรรมวิธีการสกัดสารจากครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 1 ที่ซึ่งเลือกใช้วิธีการลดความชื้นแบบการตากแห้งเป็นเวลา 12 ถึง 32 ชั่วโมง หรือ การอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 45 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง หรือ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -60 ถึง -100 องศาเซลเซียส วิธีใดวิธีหนึ่ง
5. กรรมวิธีการสกัดสารจากครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 4 ที่ซึ่ง วิธีลดความชื้นที่ดีที่สุดคือ วิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -60 ถึง -100 องศาเซลเซียส
6. กรรมวิธีการสกัดสารจากครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 1 ที่ซึ่งตัวทำละลายเลือกได้จาก เอทานอล (Ethanol) เมทานอล (Methanol) น้ำ ไดมethylซัลฟอกไซด์ (DMSO) และ อะซิเตท (Acetate) เลือกใช้อย่างใดอย่างหนึ่ง
7. กรรมวิธีการสกัดสารจากครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตามข้อถ้อยสิทธิที่ 6 ที่ซึ่งตัวทำละลายที่เลือกใช้ คือ เอทานอล (Ethanol)



รูปที่ 1

บทสรุปการประดิษฐ์

กรรมวิธีการสกัดจากครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีการคัดแยกชิ้นส่วนครามและมีการลดความชื้นด้วยวิธีการตากแห้ง หรือ การอบแห้ง หรือ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dried) จากนั้นบดให้ละเอียดและแยกขนาดอนุภาคผงคราม นำผงครามมาทำการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยเครื่องสกัดแบบซอกท์ก

5 เล็ต (Soxhlet Extraction) และนำสารละลายที่สกัดได้มาทำการระเหยแห้งสูญญากาศ ซึ่งจะได้สารสกัดครามหยาบที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น และพบว่ามีสารกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) กรดปาลมิติก (Palmitic acid) กรดสเตียริก (Stearic acid) สติกมาสเตอร์อล (Stigmasterol) แสดงให้เห็นว่าครามนั้นมีเป็น

10 พื้นที่มีศักยภาพสูงในด้านการต้านอนุมูลอิสระ และสามารถประยุกต์ใช้ในทางพฤษาเภสัชวิทยาได้ ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางด้าน เวชสำอาง ยา และ อาหารเสริม เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับครามนอกเหนือจากการใช้ย้อมผ้าเพียงอย่างเดียว

